

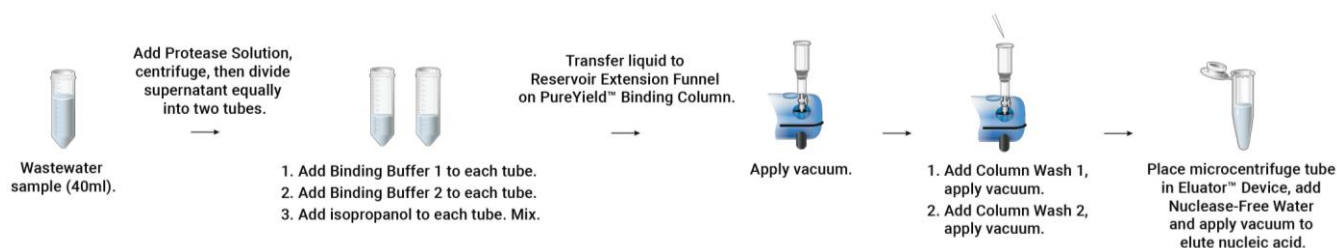
Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (カタログ番号 A2991) 日本語プロトコル

キットに含まれる構成部品はすべて 15~30℃で保管してください。

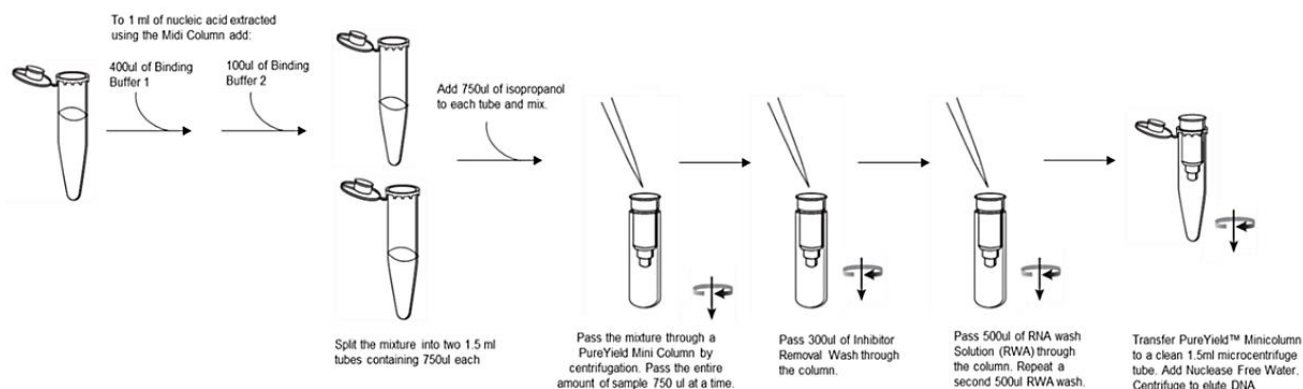
1. 実験の流れ

以下の2段階の手順で核酸精製を行います。

① 下水サンプル中の核酸の捕捉および濃縮



② スピンカラムを用いた核酸精製



2. キット以外にご用意いただくもの

- ・ イソプロパノール
- ・ 95%エタノール
- ・ 1.5ml マイクロチューブ
- ・ 50ml コニカルチューブ
- ・ 卓上遠心機 (3,000×g 以上)
- ・ スイングバケットロータ (50ml チューブ対応)
- ・ ヒートブロックもしくはウォーターバス (いずれも 60℃対応)



- ・ 高速遠心機 (10,000rpm 以上)
- ・ 吸引マニフォールド (例 : Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold Cat# A7231)
- ・ Eluator™ Vacuum Elution Device (Cat# A1071)
- ・ 吸引ポンプ (例 : Welch Vacuum Pump Cat# A6724)

3. 下水サンプル中の核酸の捕捉および濃縮

試薬の調製

1. Column Wash 1 (CWE)のボトルにイソプロパノールを 57ml 加える。
2. Column Wash 2 (RWA)のボトルに 95%エタノールを 350ml 加える。

調製後の試薬は 15~30℃で保管可能です。揮発を防ぐため、密栓して保存してください。

核酸の捕捉と濃縮

3. 40ml の下水サンプルを 50ml コニカルチューブに分取する。

補足 : 低温殺菌または未殺菌のどちらの下水サンプルも処理できます。

低温殺菌するには、サンプルを 60℃で 1 時間インキュベートします。

4. 溶出用の Nuclease-Free Water を 60℃に加温しておく (1 サンプルあたり 1ml 必要)。
 5. ステップ 3 のチューブに Protease Solution を 0.5ml 加え、転倒混和し、室温で 30 分間インキュベートする。
 6. 3,000×g で 10 分間、遠心する。
 7. 上清を 20ml ずつ新しい 50ml コニカルチューブに移す。
- * PureYield カラムの詰まりを防ぐため、遠心でサンプルに含まれる固形物をしっかり沈殿させ、持ち込まないように除去することが重要。

補足 : 沈殿物からの核酸精製を行う場合は、5.補足情報 2 に従って精製を行ってください。

8. 各チューブに Binding Buffer 1 (BBD)を 6ml、Binding Buffer 2 (BBE)を 0.5ml 加え、転倒混和して混合する。
9. 各チューブにイソプロパノールを 24ml 加え、転倒混和して混合する。
10. Reservoir Extension Funnel を PureYield™ Binding Columns に取り付け、カラムを吸引マニフォールドに接続する。
11. ステップ 9 の溶液を PureYield™ Binding Columns に取り付けした Reservoir Extension Funnel に移し、吸引を開始する。
12. 5ml の Column Wash 1 を加え、吸引する



13. 20ml の Column Wash 2 を加え、吸引する。
14. すべて吸引されたら、さらに 30 秒間、吸引を続ける。
15. 吸引を止め、カラムをマニフォールドから取り外す。
16. Eluator™ Vacuum Elution Device に 1.5ml マイクロチューブと PureYield™ Binding Columns セットする(右図)。
17. Eluator™ Vacuum Elution Device をマニフォールドに取り付ける。
18. ステップ 4 で 60℃に加温しておいた Nuclease-Free Water 500μl を PureYield™ Binding Columns に加え、吸引する。
19. もう一度 Nuclease-Free Water(60℃)を 500μl 加え、吸引する。全量 1ml の溶出液が回収される。



4. スピンカラムを用いた核酸精製

1. 溶出液 1ml に対し、Binding Buffer 1 を 400μl、Binding Buffer 2 を 100μl 加える。
 2. 転倒混和した後、750μl ずつ 2 本の新しい 1.5ml チューブに分ける。
 3. 各チューブにイソプロパノールを 750μl 加え、よく混合する。
 4. PureYield™ Minicolumn を PureYield™ Collection Tube に取り付ける。
 5. ステップ 3 の混合液 750μl をカラムに加え、10,000rpm で 1 分間遠心する。フロースルーを廃棄する。
 6. ステップ 5 を繰り返し、混合液全量をカラムに通す。
 7. Column Wash 1 を 300μl 加え、10,000rpm で 1 分間遠心する。フロースルーを廃棄する。
 8. Column Wash 2 を 500μl 加え、10,000rpm で 1 分間遠心する。フロースルーを廃棄する。
 9. ステップ 6 をもう一度繰り返す。
 10. 10,000rpm で 30 秒間の遠心を追加し、残存する液を完全に除去する。
 11. 溶出用の Nuclease-Free Water を 60℃に加温しておく (1 サンプルあたり 50μl 必要)。
 12. PureYield™ Minicolumn を新しい 1.5ml チューブに取り付ける。
 13. 60℃に加温しておいた Nuclease-Free Water 20μl を加える。
 14. 1 分間静置した後、10,000rpm で 1 分間遠心する。
 15. ステップ 13-14 をもう一度繰り返す。全量 40μl の溶出液が回収される。
- ・ -30℃~-10℃ で保管してください。
 - ・ 凍結・解凍を繰り返すのは避けてください。
 - ・ 精製された TNA は、直接 RT-qPCR に使用可能です。



5. 補足情報

下水サンプル 40ml 以外のボリュームを用いる場合

下表に従って試薬の量を調製することで実施可能です。

表. サンプル量と試薬量の比率

Sample volume (ml)	Protease Solution (ml)	Binding Buffer 1 (ml)	Binding Buffer 2 (ml)	Isopropanol (ml)
5	0.1	1.5	0.125	6
10	0.125	3	0.25	12
20	0.25	6	0.5	24
40	0.5	12	1	48
80	1	24	2	96

※サンプル量が 40ml を超える場合には、Protease Solution (Cat# A1442)、Binding Buffer 1 (Cat# A2981)、Binding Buffer 2 (Cat# MC1501) の各単品製品を追加でご用意いただく必要があります。

汚泥や沈殿固形物から精製する場合

1. 2ml までのサンプルに Nuclease-Free Water を 8ml 加える。
2. Protease Solution を 200 μ l 加え、よく混合し、室温で 30 分間インキュベートする。
3. Binding Buffer 1 (BBD)を 3ml、Binding Buffer 2 (BBE)を 250 μ l、イソプロパノールを 12ml 加え、転倒混和して混合する。
4. 3,000 $\times$ g で 10 分間、遠心する。
5. 上清を PureYield™ Binding Columns に取り付けした Reservoir Extension Funnel に移し、吸引を開始する。

補足：溶液を移す際に、沈殿物を持ち込まないように注意してください。

6. 以降は本プロトコル「セクション 3 のステップ 12」から同様に実施する。

